

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.009

大鼠主动脉内皮细胞的分离培养和鉴定

刘彦 陈绍良[△] 徐祖玲 刘志忠 阚静 毛文星

(南京医科大学附属南京医院心内科、南京市第一医院 江苏 南京 210006)

摘要 目的:探索大鼠主动脉原代内皮细胞体外培养方法,为体外研究提供细胞模型。**方法:**分离大鼠主动脉,直接贴壁于培养皿中,荧光倒置显微镜观察细胞形态,免疫组化Ⅷ因子相关抗原染色鉴定细胞。**结果:**约24小时组织块边缘有游离的新生细胞长出,7天即融合成片。消化传代后细胞呈短梭形或三角形,单层生长,铺路石状,Ⅷ因子表达阳性,呈指数增殖。冻存后复苏细胞活性均超过90%。**结论:**用贴壁法成功建立了大鼠血管内皮细胞体外培养方法,冻存细胞存活率高,为体外研究提供了稳定的模型。

关键词:大鼠;主动脉内皮细胞;培养;鉴定;复苏

中图分类号:Q95-3, Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)05-834-03

Isolation Culture and Identification of Rat Aortic Endothelial Cells

LIU Yan, CHEN Shao-liang[△], XU Zu-ling, LIU Zhi-zhong, KAN Jing, MAO Wen-xing

(Department of Cardiology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the culture methods of primary rat aortic endothelial cells in vitro. **Methods:** Rat aorta was isolated, directly attached to the wall in a petri dish, and inverted microscope cell morphology. Immunohistochemistry factor VIII-related antigen was used to stain cells. **Results:** Organization block edge free new cells grow, after approximately 24, and integrated into the film 7d later. Cells were subcultured short spindle-shaped or triangular, monolayer, cobblestone, positive expression of factor VIII, the exponential proliferation. Recovery was more than 90% cell viability after cryopreservation. **Conclusion:** Vascular endothelial cells in vitro method was successfully established by adherent, and the survival rate of frozen cells was high, which providing a stable model for in vitro studies.

Key words: Rat; Aortic endothelial cells; Culture; Identify; Recovery

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-834-03

前言

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)是覆盖在血管内膜表面纵向排列的单层扁平细胞,作为血管内膜的主要结构,在创伤修复、血管生成、止血、血栓形成、出血性疾病、动脉粥样硬化、糖尿病等一系列生理和病理过程中发挥重要作用^[1-4]。关于血管内皮细胞的原代培养^[5,6],国内20世纪80年代初即有报道。但是检索相关文献发现对于大鼠的报道较少,且多为酶消化法,所得内皮细胞较难纯化,传代培养时受成纤维细胞影响^[5,9]。本研究采用血管组织贴壁法,成功的对大鼠主动脉内皮细胞的分离培养、传代、冻存、复苏与鉴定,旨在获得足够数量和纯度的VEC,为进一步研究血管内皮相关疾病建立成功的体外细胞培养模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康SD大鼠,4周龄,80g左右,由南京青龙山动物中心提供。

1.1.2 仪器 离心机(德国Beckman),CO₂细胞培养箱(美国Thermo),超净工作台(21K-200型)(国营346厂),荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯),磨砂玻片(经10%多聚赖氨酸处理)。

1.1.3 试剂和耗材 胎牛血清(美国Gibco公司),改良1640培养基(美国Gibco公司),0.125%胰蛋白酶(上海碧云天),青霉素-链霉素溶液(上海碧云天),Ⅷ因子抗体(北京博奥森),二抗(DAKO, DENMARK);苏木素染色液、中性树胶、多聚赖氨酸、肝素及二甲苯等为国产培养皿、培养瓶、移液器、离心管(美国Corning)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离、培养及传代 无菌状态下,开胸分离SD大鼠主动脉,迅速用生理盐水冲洗干净,放到含双抗的DHanks液的冰盒中,洗净血管内外的凝血块,纵向剪开管腔,平铺于培养皿中,用手术刀轻轻将血管切成边长约0.1cm的正方形,间隔放置于培养皿中,加入含10%胎牛血清的改良1640培养基,不能将组织块悬浮,5%CO₂,37℃饱和湿度的培养箱中培养。待组织块周围生长的细胞融合成片,即可去除组织块,用胰蛋白酶消化法消化细胞,重新接种于培养瓶中,待细胞生长至80%,胰蛋白酶消化后1:2传代。

1.2.2 增殖生长力的测定 取培养的第3代细胞,待其增长至80%融合,生长状态良好,0.25%胰蛋白酶消化、制备成细胞悬液;取24孔细胞培养板,等量接种21孔,置5%CO₂,37℃饱和

作者简介:刘彦(1978-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:冠心病的基础研究,电话,13814083692, E-mail: lyfxyd@163.com

△通讯作者:陈绍良,主任医师,博士, E-mail: chmengx@126.com

(收稿日期:2013-07-14 接受日期:2013-08-12)

湿度的培养箱中培养,次日起,每天取其中3孔细胞进行检测,取均值,培养1周,共七组数据,绘成生长曲线。

1.2.3 细胞形态学 倒置显微镜逐日观察原代及传代培养细胞生长、增殖情况及形态特征。

1.2.4 免疫组化检测Ⅷ因子相关抗原 取第3代细胞进行细胞爬片,PBS洗2遍;4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗2遍;1%的Triton-100室温放置15 min;3% H_2O_2 甲醇溶液室温孵育30 min,PBS洗2遍;正常山羊封闭血清室温孵育30 min;加一抗(Ⅷ因子抗体)1:20,100 μ L,37℃,湿盒孵育2 h;增强剂50 μ L,室温湿盒孵育20 min;HRP标记二抗50 μ L,室温37℃,孵育30 min;2滴新鲜配制的DAB溶液染色,蒸馏水终止反应;苏木素复染30 min,盐酸甲醇溶液分化;70%、75%、85%、95%、100%乙醇依次脱水,二甲苯透明,中性树胶封片^[9]。

1.2.5 细胞冻存与复苏 经胰蛋白酶消化后,收集第3代对数生长期细胞,加入冻存液分装于2 mL冻存管内,冻存细胞数为 2×10^6 mL,置于4℃ 30 min、-20℃ 2 h,后于液氮中长期保存。冻存两周后,取出冻存管立即置入40℃水中迅速解冻复苏,加入5 mL培养液混匀,1000 r/min,离心5 min,弃上清加入培养液重悬细胞,以 5×10^5 mL接种于25 cm²培养瓶内,5%CO₂、37℃饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.6 复苏细胞存活率的测定 取复苏后培养5 d的细胞,胰蛋白酶消化后,1640培养液制成细胞悬液,取0.9 mL,加入0.1 mL 1%台盼蓝混匀,计数板盲法计数,细胞内染色者为死细胞,未染色者为活细胞,以活细胞数占细胞总数的百分比反映细胞活力^[10]。

2 结果

2.1 细胞形态

倒置显微镜见接种4 h后,组织开始铺展贴壁,18-24 h可见组织块边缘有游离的新生细胞长出,呈单层扁平多角或梭条形细胞集落,约5-7 d,细胞迅速生长,集落增大,呈多角形,汇合、融合时细胞镶嵌排列呈铺路石样。传代的内皮细胞贴壁时

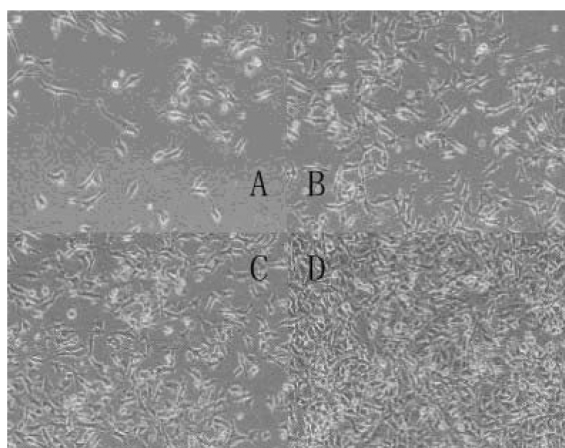


图1 内皮细胞体外分离培养:A:第1天、B:第3天、C:第5天、D:第7天($\times 100$)

Fig.1 Endothelial cells cultured in vitro: A:The first day, B:The third day, C:The fifth day, D:The seventh day

间明显提早,刚消化下来的细胞呈圆形,接种后30 min即有细

胞贴壁,生长活跃,分裂增殖活动旺盛,第2天,可在多个视野中观察到贴壁细胞,第3天,可观察到大量贴壁细胞,呈群居势生长,增值较快,至第6~7天,可见细胞呈铺路石状生长;5代内的细胞形态、活力及生长曲线无明显差异(图1)。

2.2 冻存后复苏

第3代细胞在液氮中保存1个月,分2批复苏。复苏后的细胞2h即可贴壁,24h换液,经台盼蓝测定细胞活力,可以达到90%,证明接种后大部分存活,培养1周,细胞生长良好,细胞形态与冻存前无明显差异(图2)。

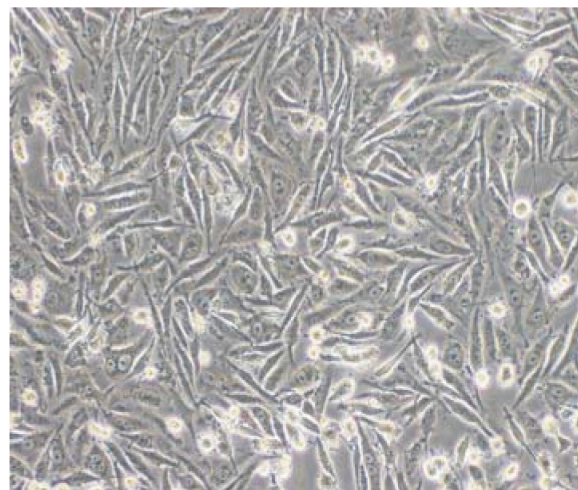


图2 冻存后复苏的细胞($\times 100$)

Fig.2 Cryopreservation recovery cells ($\times 100$)

2.3 Ⅷ因子相关抗原鉴定

在光学显微镜下将培养的传代细胞经Ⅷ因子免疫组化鉴定,阳性细胞数大于95%,为细胞膜上有黄褐色细颗粒或粗颗粒附着,证明培养细胞具有内皮细胞特异性(图3)。

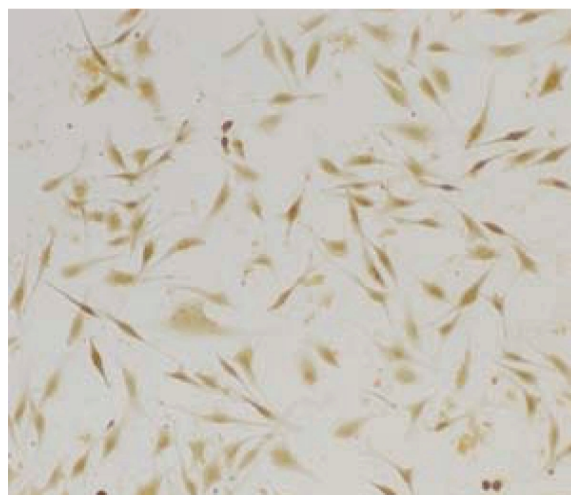


图3 内皮细胞诱导培养后(免疫组化 $\times 100$)

Fig.3 Endothelial cells cultured (immunohistochemistry $\times 100$)

2.4 细胞生长曲线

传代细胞接种后2h即贴壁开始生长,前两天生长速度较慢,3到5 d时生长速度明显加快,维持在对数生长期;6、7 d起细胞发生接触性抑制,进入停滞期。细胞倍增时间约为72 h。根据原始数据绘制的细胞生长曲线结果(图4)。

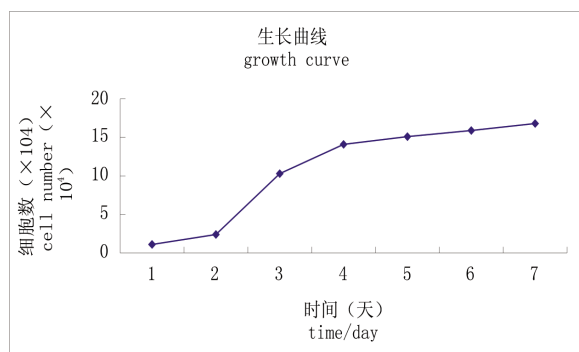


图4 细胞生长曲线

Fig.4 Cell growth curve

3 讨论

内皮细胞是组成血管腔面单层扁平上皮的一种细胞,大多成梭形,核比较突出,排列和血流的方向一致,在动脉的分支处,内皮细胞可变成圆形。它的核居中,淡染,核仁大明显,胞质内有发达的高尔基体,粗、滑面内质网以及丰富的质膜小泡,胞质内还可见成束的微丝和一种外包单位膜的杆状细胞器称W-P小体^[12,13]。广泛的分布于人体,作用除作为血液和组织之间的物质交换屏障外,还可合成和分泌多种的生物活性物质维持正常的心血管功能,如内皮细胞表面有血管紧张素转换酶,能使血浆中的血管紧张素I转化为血管紧张素II,使血管收缩^[14-16]。内皮细胞的脱落及生长快慢的变化,对血流的速度、毛细血管的通透性、心血管疾病及癌细胞的生长都有密切的关系^[17]。由于其在体内分布广,作用多,因此在广泛用于多种实验研究,对于内皮细胞的体外培养方法的探索也日益增多。

研究发现内皮细胞培养多通过消化法或组织块贴壁法^[18-20]。而不同种属来源的内皮细胞其形态特性、结构功能是不同的。因此,不同的动物具体的消化方法也不同;如人脐静脉内皮细胞多用胰蛋白酶灌注消化法,兔子血管内皮细胞可用胶原酶消化法。本课题组曾用过多种方法来获取大鼠内皮细胞,比较发现运用组织块贴壁法效果最好,所得的细胞纯度高,传代后细胞生长良好,冻存复苏的细胞其复活率高,可以满足实验需求。在培养方法上,需要注意:取得的离体血管需要用生理盐水冲洗干净,及时放置在冷含双抗的DHanks液的冰盒中保存活性;放入培养皿时组织块不宜过大,排列均匀;加入细胞液时绝对不能将组织块悬浮,及时放入孵育箱中;培养前两天不宜挪动培养皿,更不可以频繁观察细胞。用此方法分离的细胞很快贴壁,且混杂的平滑肌细胞和纤维细胞很少。由于此法容易受到污染,所以在操作过程中应特别注意无菌操作。

参考文献 (References)

- [1] Tian S, Tang J, Liu H, et al. Propyl gallate plays a nephroprotective role in early stage of diabetic nephropathy associated with suppression of glomerular endothelial cell proliferation and angiogenesis [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012:209567
- [2] Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, et al. Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(11):e424
- [3] Ohkita M, Tawa M, Kitada K, et al. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 119(4):302-313
- [4] Wang S, Hirschberg R. Diabetes-relevant regulation of cultured blood outgrowth endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2009, 78(2):174-179
- [5] Ghanaati S, Fuchs S, Webber MJ, et al. Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(6):e136-143
- [6] Chen J, Liu J, Han Q, et al. Towards an optimized culture medium for the generation of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40):31066-31072
- [7] Tang QH, Zhang YM, Xu YZ, et al. Up-regulation of integrin beta3 expression in porcine vascular endothelial cells cultured in vitro by classical swine fever virus[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 133(2-4):237-242
- [8] Abbott NJ, Dolman DE, Drndarski S, et al. An improved in vitro blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 814:415-430
- [9] Chen C, Li Q, Sun R, et al. Experimental study on adhesiveness of osteoblasts and vascular endothelial cells from rat BMSCs co-cultured on allogeneic freeze-dried partially bone in vitro [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2009, 23(9):1129-1133
- [10] Wu H, Li Y, Shen Z. Expression of class II major histocompatibility antigen and factor VIII related antigen in endothelial cells of blood vessels in malignant lymphomas [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 1998, 27(1):27-30
- [11] Huang LC, Lin W, Yagami M, et al. Validation of cell density and viability assays using Cedex automated cell counter [J]. *Biologicals*, 2010, 38(3):393-400
- [12] Hsieh HL, Schafer BW, Cox JA, et al. S100A13 and S100A6 exhibit distinct translocation pathways in endothelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(5):3149-3158
- [13] Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, et al. Reduction of alpha-galactosyl xenoantigen by expression of endo-beta-galactosidase C in pig endothelial cells[J]. *Xenotransplantation*, 2002, 9(4):290-296
- [14] Oberleithner H, Kusche-Vihrog K, Schillers H. Endothelial cells as vascular salt sensors[J]. *Kidney Int*, 2010, 77(6):490-494
- [15] Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, et al. Endothelial dysfunction and aging: an update[J]. *Ageing Res Rev*, 2010, 9(2):142-152
- [16] Matsui T, Nishino Y, Maeda S, et al. Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mRNA levels in glomerular endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2011, 81(3):269-273
- [17] Lipowsky HH, Gao L, Lescanec A. Shedding of the endothelial glycocalyx in arterioles, capillaries, and venules and its effect on capillary hemodynamics during inflammation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6):H2235-2245
- [18] Krause P, Markus PM, Schwartz P, et al. Hepatocyte-supported serum-free culture of rat liver sinusoidal endothelial cells [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(5):718-726
- [19] Cai W, Liang L, Ji P, et al. Experimental study on culture method of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chinese Journal of Respiratory and Reconstructive Surgery*, 2011, 25(2):139-143
- [20] Kajimoto K, Hossen MN, Hida K, et al. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine inguinal and epididymal adipose tissues[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 357(1-2):43-50